

⑪ 公開特許公報(A) 平1-124382

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)5月17日

C 12 N 5/00
A 61 K 9/10
35/12E-8515-4B
L-7417-4C
8213-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 36 (全21頁)

⑭ 発明の名称 導入抗原タンパク質を有する動物由来細胞

⑮ 特 願 昭63-164103

⑯ 出 願 昭63(1988)6月30日

優先権主張 ⑰ 1987年6月30日 ⑱ 米国(U.S.) ⑲ 068288

⑳ 1988年5月27日 ㉑ 米国(U.S.) ㉒ 197445

⑳ 発 明 者 イヴ セ ニコロ アメリカ合衆国 テキサス州 77840 カレッツ ステーション フォックスファイア ファーレイ 2100

㉑ 発 明 者 ガレット エム イー アメリカ合衆国 テキサス州 77840 カレッツ ステーション ラングフォード ストリート 1115

㉒ 出 願 人 ハツブゴード セーヴ オランダ領アンテル キュラソー デ リュイター カーデ 62 キュラソー インターナショナル トラスト コムパニー ナームローゼ フェンノートチャツプ内

㉓ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 8 名

最終頁に続く

明細書の序言(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称 導入抗原タンパク質を有する動物由来細胞
2. 特許請求の範囲
 - (1) 細胞の他の細胞に対する結合およびそれとの融合を誘発する抗原タンパク質を膜中へ導入された動物由来細胞。
 - (2) 動物細胞が血液由来細胞である、請求項(1)記載の動物由来細胞。
 - (3) 細胞が赤血球である、請求項(1)記載の動物由来細胞。
 - (4) 細胞と、挿入させるタンパク質を二重層内に含むリボソームとのpH誘発融合により抗原タンパク質が細胞内に挿入された、請求項(1)記載の動物由来細胞。
 - (5) 動物由来細胞と、挿入させる抗原タンパク質を二重層内に含むリボソームとのフッ素ゲン誘発融合により抗原タンパク質が動物由来細胞内に挿入された、請求項(1)記載の動物由来細胞。
 - (6) フッ素ゲンがタンパク質またはペプチドであ

る、請求項(6)記載の動物由来細胞。

- (7) フッ素ゲンがポリエチレングリコールである、請求項(6)記載の動物由来細胞。
- (8) さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の細胞障害物質を含む、請求項(1)記載の動物由来細胞。
- (9) 細胞障害物質がタンパク質である、請求項(8)記載の動物由来細胞。
- (10) 細胞障害物質がリシン、アブリン、ゲロニン、およびジフテリア毒素、並びにそれらの毒物学的活性フラグメントからなる群から選ばれる、請求項(8)記載の動物由来細胞。
- (11) 細胞障害物質がゲロニンまたはその毒物学的活性フラグメントである、請求項(8)記載の動物由来細胞。
- (12) 抗原タンパク質がヒトCD4抗原である、請求項(1)記載の動物由来細胞。
- (13) さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の細胞障害物質を含む、請求項(8)記載の動物由来細胞。

- 04 細胞障害物質がリシン、グロニン、アブリン、およびジフテリア毒素、並びにそれらの毒物学的活性フラグメントからなる群から選ばれる、請求項03記載の動物由来細胞。
- 05 さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の治療薬を含む、請求項04記載の動物由来細胞。
- 06 治療薬が抗ウイルス薬である、請求項04記載の動物由来物質。
- 07 治療薬がA Z T、アジド-3'-デオキシチミジン(A Z T)三リン酸、ジデオキシチジン三リン酸およびリバビリンからなる群から選ばれる、請求項04記載の動物由来物質。
- 08 二重層内にヒトCD4抗原を取込んだリボソーム。
- 09 さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の細胞障害物質を含む、請求項04記載のリボソーム。
- 08 細胞障害物質がリシン、グロニン、アブリン、およびジフテリア毒素、並びにそれらの毒物学的活性フラグメントからなる群から選ばれる、

請求項04記載のリボソーム。

- (21) さらに、中に取込まれた1種またはそれ以上の治療薬を含む、請求項08記載のリボソーム。
- (22) 治療薬がA Z T、アジド-3'-デオキシチミジン(A Z T)三リン酸、ジデオキシチジン三リン酸、およびリバビリンからなる群から選ばれる、請求項(21)記載のリボソーム。
- (23) 薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項08記載の細胞の治療有効量を含む組成物。
- (24) 薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項04記載の細胞の治療有効量を含む組成物。
- (25) 薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項08記載のリボソームの治療有効量を含む組成物。
- (26) 請求項08記載の細胞の治療有効量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。
- (27) 薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁され

た請求項08記載のリボソームの治療活性量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。

- (28) 薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項08記載の細胞と請求項08記載のリボソームとの混合物の治療活性量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。
- (29) 疾患が後天性免疫不全症候群である、請求項(26)記載の方法。
- (30) 疾患が後天性免疫不全症候群である、請求項(27)記載の方法。
- (31) 疾患がエイズ関連コンプレックスである、請求項(28)記載の方法。
- (32) 薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された請求項08記載の細胞の治療活性量を患者に投与することを含む患者中の疾患を治療する方法。
- (33) 血液細胞中のウイルス粒子の存在を測定する定量的検定法であって、
- (a) 請求項08記載のリボソームの試料(試薬リボソームと称す)を調製する、

- (b) ウイルス疾患をもつ疑いのある患者から血液の試料をとり、それから白血球(試験血液細胞と称する)を捕集する、
- (c) 健康なヒトから血液の試料をとり、それから白血球(対照血液細胞と称する)を捕集する、
- (d) 試験血液細胞および対照血液細胞を放射性同位体の元素で標識する、
- (e) 等数の放射性標識試験血液細胞を培養皿の3ウエルのそれぞれ中へ、および等数の対照血液細胞を前記培養皿の他の3ウエル中へ、6ウエルがそれぞれ同数の細胞を含むように塗布する、
- (f) 3対照細胞含有ウエルの1つおよび3試験細胞含有ウエルの1つに試薬リボソームの分割量を加えて少くとも1~10リボソーム毎細胞の最終量通比で、しかしともかく対照および試験細胞試料のそれぞれに対して等しいリボソーム/細胞比を生成させる、
- (g) 6ウエルのそれぞれの中の細胞を約37℃

の最適温度で細胞-リボソーム融合を起させる十分な時間(最適には約10~24時間)インキュベートする、

- (n) 4つの非リボソーム含有ウエルの、1つのウエルが試験細胞を含む他のウエルが対照細胞を含む2つのウエルに、1%トライトニンX-100または他の適当な洗浄剤0.1mlを加えることにより2ウエル中の細胞を溶解する、
- (i) 培養のそれぞれの上澄み液を少くとも100μlの分割量とり、それらの中の放射能を液体シンチレーションまたは等価の操作により測定する、
- (j) 試験血液細胞および対照血液細胞の両試料に対する比遊離(SP REL)の値を式、

$$SP \text{ REL} = \frac{ER - SR}{MR - SR}$$

(式中、SP REL、ER、MRおよびSRは本明細書の実施例5においてそれらに帰着させた意味を有する)を用いて計算する、

3.発明の詳細な説明

発明の背景

本発明は、細胞の他の細胞に対する結合およびそれとの融合を誘発する抗原タンパク質を膜中へ導入された動物由来細胞に関する。より詳しくは本発明は、外膜がその中に、修飾された細胞またはリボソームを種々の標的細胞、殊にウイルス例えばヒト免疫不全ウイルス(以下HIVとして示す)に感染した細胞に生体内および試験管内で選択的に結合させる特異性タンパク質物質を取込んだ修飾された細胞およびリボソームに関する。

背景の情報

後天性免疫不全症候群(エイズ)は明示された年代学的配列の症状および高い死亡率を特徴とするビルレント疾患である(カラン(Curran, J.W.)ほか、「エイズの疫学」、サイエンス(Science), 229, 1352~1357(1985))。エイズは1981年に初めて記載され、そのときから米国のみで約400,000例を有する流行割合および90%以上の3年死亡率に達した。今日米国中

ことを含む方法。

- (34) 試験血液細胞および対照血液細胞がリンパ球である、請求項(33)記載の検定法。
- (35) 放射性元素がクロム-51である、請求項(33)記載の検定法。
- (36) 存在を測定されるウイルス粒子がエイズウイルス粒子である、請求項(33)記載の検定法。

に約100万のヒトがヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染されたと推定される。HIVはコアタンパク質、ゲノムRNAおよび酵素逆転写酵素を含むレトロウイルスとして分類されている。HIVの若干の抗原に対する抗体が感染したヒトの血清中に存在する。

エイズにおける免疫不全の特徴はT4ヘルパー/インデューサーリンパ球の消耗である(ゴットリーブ(Gottlieb)ほか、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディスン(N. Eng. J. Med.), 305, 1425~1431(1981))。この欠損は主にリンパ球のこの集団のHIVによる選択的感染の結果である。ヘルパーリンパ球の表面上に存在するT4分子(CD4抗原を示す)はT4リンパ球の表面に対する特異的結合後に細胞内に入るHIVウイルスに対する受容体として関連づけられた(ダルクレイシュ(Dalkleish)ほか、ネイチャー(Nature), 312, 763~767(1984))。ウイルスが入る機構は完全には示されなかったが、しかし受容体仲介エンドサイ

トリスまたはHIVエンベロープと細胞膜との直接融合に類似するであろう[ステイン(Stein)ほか、セル(Cell), 4, 659~668 (1987)]。

フーズゲン(fusogen)タンパク質、gp120(分子量120,000ドルトンの糖タンパク質)と称される[マクドウガル(Mc Dougall)ほか、サイエンス(Science), 231, 382~385 (1986)]、がHIV表面上に認識され、このタンパク質がウイルスとリンパ球との間の融合を仲介する作用をすることができる。細胞の内部に入るとウイルスRNAが逆転写酵素によりDNA中へ転写される。その後DNAが宿主ゲノム中へ組み込まれる。しかし、HIV DNAの大部分は組み込まれないで細胞質中に保たれる。現在、感染細胞が「活性化されるまでHIV複製がこの段階で制限されることが知られている[マクドウガル(Mc Dougall)ほか、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunology), 135, 3151~3162 (1985)]。HIV感染後の複製の潜在的活

性化因子にはウイルス例えばB型肝炎、ヒトサイトメガロウイルスおよび単純ヘルペスウイルスが含まれると思われている。活性化後、HIVが複製され、次いで細胞表面上に組立てられる。次いで成熟ビリオンがT4リンパ球の表面膜からの出芽により形成される。HIV複製の開始後T4リンパ球が殺されるであろう。

T4リンパ球に対するHIVウイルスの細胞変性効果は現在知られていないけれども、HIV感染が起ると、ウイルスのgp120抗原が感染T4リンパ球の表面上に発現されることが観察された。このタンパク質の通常存在するCD4抗原に対する親和性のために他のT4リンパ球(未感染でCD4抗原を有する)が感染リンパ球と融合することができる。生じた細胞の結合および融合が、融合に含まれた両方またはすべての細胞を殺すと思われる[ザグリ(Zagury)ほか、サイエンス(Science), 231, 850~853 (1986)]。例えば、表面上にCD4抗原のない細胞系のT4リンパ球並びに細胞と抗CD4抗体との反応によ

り抗原がマスクされたT4細胞は通常状態でHIV感染T4細胞との融合を示さない[マクドウガル(Mc Dougall), 前掲]。

この融合過程は若干のHIV感染および多数の非感染T4細胞を包含することができ、大シシテムの形成を生ずることができ、それが次いで細胞内皮系の細胞により循環から除去されるか、さもなければ溶解することができる(例えば脂のような器管中)[ショー(Shaw)ほか、サイエンス(Science), 227, 177~181 (1985); ガートナー(Gartner)ほか、サイエンス(Science), 233, 215~219 (1986)]。

T4リンパ球は免疫応答において中心的役割を演ずる。それはマクロファージ、細胞障害性T細胞、NK(ナチュラルキラー)細胞およびBリンパ球とともに均一に含まれる。従って、T4リンパ球集団の選択的消耗でも多くの免疫欠損を生じ、エイズに特有の生命を脅かす日和見感染を生ずる[ボウエン(Bowen)ほか、アナリス・オブ・インターナル・メディスン(Ann. Intern. Med.), 103,

704~709 (1985)]。さらに単球およびマクロファージの一定集団もまたCD4抗原を発現し、研究によりこれらの細胞もまたHIV感染されることができることが示された[ホー(Ho)ほか、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.), 77, 1712~1715 (1986)]。単球のHIV感染は毒性性における欠損を生ずることができ、それはエイズで報告された。感染マクロファージはHIVウイルスを中枢神経系へ運ぶことができ、この疾患に生ずる急性性脳炎の発現を可能にする[ガブズダ(Gabuzda)ほか、アナリス・オブ・ノイロロジー(Ann. Neurology), 20, 289~295 (1986)]。HIV感染単球は腫瘍壊死因子を含む種々の因子を生ずることができ、それがエイズの慢性熱およびまた悪液質の関連状態(一般栄養不良)を説明できた。

さらに、新抗原に対する低い抗体応答と結合した高濃度の免疫グロブリンによる多クローン性活性化からなるBリンパ球異常がエイズで普通であ

り、HIV感染の直接的結果であることができる。エイズの一層進行した段階における患者は通常無力性である（すなわち、普通の抗原に対する減退した免疫応答を示す）。

エイズは治療が非常に困難なことが証明され、治癒するに任される。これまでに若干の異なる方法が試みられた。現在研究されている可能性のある処置は次のものである：

(a) 逆転写酵素の阻止因子

この型の治療は、標的酵素がヒト細胞に見出されないの非常に選択的であることができる。この種の始原型薬物はアジド-3'-デオキシチミジン (AZT) である。この薬物はI、IIおよびIII期の研究に合格し、現在エイズをもつ患者および以前にニューモシステス (pneumocystis) 感染を有した患者の治療に承認されている。研究はこの薬物で処置した患者がヘルパーTリンパ球の高濃度を示した約1/3が陽性皮膚試験を示すことを示した（後者は以前に無力性であった）。さらに、その疾患に特有の

神経系欠損に対する改善がある（ヤーチュエン (Yarchoon) ほか、ランセット (Lancet), 575 ~ 580 頁 (1986) 参照)。しかし、臨床および免疫パラメーターにおける前記改善にもかかわらず、ウイルスがリンパ球中に生き残ることが認められる。

(b) 一般抗ウイルス剤

現在リバビリン (ribavirin)、ホスカーネット (Foscarnet) (HPA-23) およびスラミン (Suramin) のような化合物が研究中である。現在これらの物質の有効性について利用できるデータがない。

(c) 免疫調節物質

この型の処置にはエイズをもつ患者中の欠損免疫系を高めまたは再構成する試みが包含される。そのような試みは数年間行なわれた。試験された免疫調節物質の1つはα-インターフェロン、抗ウイルス免疫調節および抗増殖効果を有する白血球由来糖タンパク質である。この物質はヒト患者に単に最少の有効性を示したが、

許容できない毒性水準を示した（ゲルマン (Gelmann) ほか、アメリカン・ジャーナル・オブ・メディスン (Am. J. Med.), 78, 737 ~ 741 (1985)）。エイズ患者に試験された類似物質はインターロイキン-2である。後者はTリンパ球の全数を高め、リンパ球からのHIVの分離を低下するが、しかし排除しないことが示された。それはまたカポジ肉腫、後者はエイズの一層進行した期に関連する悪性腫瘍、の最少程度の進行に関連づけられた（ブロッダー (Broder) ほか、ランセット (Lancet), 627 ~ 630 頁 (1985)）。

(d) 移植

骨髓移植が若干のエイズ患者に試みられ、その目的は患者の免疫反応性の再構成であった。そのような療法は長期継続よりはむしろ一過性の状態の改善を生じたにすぎなかった。

リボソームと細胞または核エンペロープとを有効に溶解させる方法が記載された

(アービンテ (Arvinte) ほか、バイオケミスト

リー (Biochemistry), 26, 765 ~ 772 (1986) 参照)。多くの場合に、そのような融合は、タンパク質、ペプチド、ポリエチレングリコール、ウイルスエンペロープタンパク質などであることができるフソーゲンといわれる誘発性物質を用いて行なわれた。若干の場合に融合誘発性物質には媒質の改変状態が包含される。従って、低pHがリボソームと核エンペロープとの融合の誘発に有利に使用された（アービンテ (Arvinte) ほか、バイオケミストリー (Biochemistry)、前掲）。

操作は以前には生体内の特定細胞に対する異なる分子の標的送達のために開発された〔ニコラウ (Nicolau) ほか、ビオシムカ・エ・ビオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta), 805, 354 ~ 367 (1984)〕。そのような標的性は二重層中に特定の選択された糖脂質を含有したリボソームの使用により実現された。そのような糖脂質はそれらの上の、標的細胞の形質膜上の1またはそれ以上のレクチン（一定の型の炭水

化物構造に特異的に結合する植物細胞から誘導された物質)により認識された末端炭水化物の存在を基にして選択された〔ニコラウ (Nicolau)ほか、ブローディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), 80, 7128-7132 (1983) 参照〕。そのような方法が働くには、標的細胞がその膜内に他の細胞の膜内に存在する分子に対し特異性でそれに結合する受容体を含まねばならない。次に細胞の融合を誘発することが必要であり、それはフーズゲン物質を用いて実験的に、または自然にウイルス感染に由来するタンパク質のような一定の融合剤により行なうことができる (ガロ (Gallo) ほか、サイエンス (Science), 224, 500-503 (1983))。

発明の概要

本発明の目的は、種々の細胞毒素および溶菌物質、有利にはタンパク質リシンを取込ませたCD4保持細胞、有利には赤血球、あるいはリボソームを生成させることによりHIV感染細胞とCD

4保持細胞との選択的融合を利用することである。そのような方法はHIV感染細胞の選択的な殺害を生ずる。そのような目的は形質膜または脂質二重層 (場合による) 中にCD4抗原をもち、かつ細胞障害物質例えばリシン、ゲロニンおよび (または) それらと等価の物質を含有する一群のエンジニアード (engineered) 赤血球またはリボソームの構築により実現される。

本発明の他の目的は抗原を細胞の形質膜中へ導入する方法を提供することである。

本発明の目的はまた、毒性および細胞溶解物質を選定リボソームおよび細胞中へ取込ませる方法を提供することである。

本発明の他の目的は、そのようなエンジニアード細胞またはリボソームの最適量を罹患患者中へ導入し、ウイルスが感染標的細胞内で複製するかまたは他の健全細胞に対する細胞の結合を促進してウイルスを拡散またはそれらに対する身体の防御を阻害することができる前に、これらの細胞またはリボソームを生体内でウイルス感染細胞に結

合させ、それと融合して破壊させることによりウイルス疾患状態を軽減することである。

本発明の目的はまた、CD4タンパク質を膜中へ挿入することにより修飾した異種赤血球 (および (または) リボソーム) を投与し、その結果、これらの細胞 (および (または) リボソーム) をHIV感染細胞に選択的に結合させ、付随して融合させてHIV感染細胞を循環から排除させる方法を提供することである。

これらおよび他の目的、目標および利点は本発明により実現される。

本発明は、細胞の他の細胞に対する結合およびそれとの融合を誘発する抗原タンパク質を膜中へ導入された、例えば人為的に取込ませた動物例えばヒト由来細胞に関する。

本発明はまた、薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された前記動物由来細胞の、1種またはそれ以上の細胞障害物質と協力した治療有効量を投与、例えば注射、することを含むウイルス誘発疾患の治療に関する。

本発明はまた、薬理学的に許容される希釈剤中に懸濁された前記動物由来細胞の、1種またはそれ以上の細胞障害物質と協力した治療有効量を含む組成物を指向する。

発明の詳細な説明

(a) 発明の性質

本発明は、ヒトCD4抗原を形質膜中へ取込み、エンジニアード細胞と融合する細胞を破壊できる1種またはそれ以上の細胞障害物質を細胞内に含有する型のエンジニアード赤血球を具体化する。これらのエンジニアード赤血球の代りにリボソームを製造して同様に用いることができる。本発明はまたこれらの細胞を正常赤血球から製造する方法に関する。本発明はさらにこれらのエンジニアード赤血球 (またはリボソーム) をウイルス感染により起された疾患、殊に後天性免疫不全症候群 (エイズ) の治療に使用する方法を具体化する。もちろん、エンジニアード赤血球が示されるととき常に本明細書に記載する他リボソームもまた使用できることを留意すべきである。

提案した治療の主な特徴は次のとおりである。
膜上にCD4受容体をもつ赤血球はウイルスgp120表面糖タンパク質を表現する循環HIV感染細胞に結合できる。そのような凝集体は次いで脾臓マクロファージおよび肝臓のクッパー(Kupffer)細胞により循環から除去される。

細胞凝集体の取込みによるこれらの食細胞の細胞の可能な感染を防ぐために、一定の抗HIV薬例えばAZTまたはDDC-三リン酸(AZTはアジド-3'-デオキシチミジンであり、DDCはジデオキシシチジンである)が注射前にCD4保持赤血球中に封入される。食作用は薬物の存在なくHIV感染細胞の破壊を有効に生ずるけれども、赤血球中のそのような抗HIV薬の取込みにより追加の保護が生ずる。

HIV感染細胞が選択的に結合し、ついにはCD4抗原を有する非感染細胞と融合する傾向があるので、我々はこの抗原を形質膜上に有する細胞が、赤血球であっても、HIV感染細胞および(または)HIVウイルス自体と選択的に結合

し、おそらく融合することを仮定し、証明した。HIV感染細胞が細胞溶解物質を含む他の細胞と融合すると感染細胞が破壊される。

ウイルス感染細胞の破壊における作用物質として臨床的に有効であるために、エンジニアド細胞は次の性質を有さねばならない：(1)それらが長く持続する、すなわち生体内で少くとも細胞、この場合赤血球、の正常寿命に接近する寿命を有さねばならない；(2)それらが、それらに含まれる細胞障害物質が身体の組織に無作用に作用しないような低毒性でなければならない；(3)それら自体が、それらの中に置かれた毒素により不利に影響されてはならない(そうでないと、それらが標的細胞を捜し出して選択的に融合できる前に毒されるであろう)；(4)それらはまた標的(すなわち感染した)細胞との融合にのみ選択的であって他の健全な細胞とは結合も融合もしてはならない；(5)それらは、それらがレシビエント中で不利な抗原反応を起し従って患者のすでに負担のかかった免疫系にさらに負担をかけること

のないように非免疫源でなければならない。本発明に含まれる修飾赤血球(およびリボソーム)がそのような役割に対する良好な候補であることが発見された。これは、それらが他の細胞の生体繁殖装置を欠き、それらの寿命の間実質的に血流中の酸素を運ぶ役目をするヘモグロビンの囊にすぎないためである。従って、それらは、それら自体その中の種々の細胞障害物質の存在により不利に影響されない。赤血球は血流中の最も多い細胞の1つであるので、抗原修飾毒素積載細胞によるその少部の置換は生物体にとってほとんど重大でない。さらに、毒素が修飾赤血球内に隔離されるので、単に注射された治療薬の場合のように生物体の組織と不規則に相互作用することが自由でない。

(b) リボソーム

水性媒質を囲む脂質二重層(2分子の厚さ)からなる。

リボソームは一般に水性媒質中の脂質の音波処理により、乾燥脂質層の緩衝液中の再懸濁により、または有機溶媒中に溶解した脂質の選択緩衝液に

対する透析により形成することができる。

リン脂質はそれを水と混合すると一部は分子が両性である：それらが疎水性(水不溶性)尾部および親水性(水溶性)または「極性」頭部を有する、ので閉鎖流体充填球体を形成する。2つの脂肪酸鎖、それぞれ10〜24個の炭素原子を含む、が多くの天然存在リン脂質分子の疎水性尾部を構成する。若干の水溶性分子に結合したリン酸が親水性頭部を構成する。十分高い濃度のリン脂質を水と混合すると疎水性尾部が自然に一緒に並んで水を排除し、親水性頭部が水を結合する。

その結果、脂肪酸尾部が膜の内部へ向き、極性頭部基が外方へ向く二重層である。膜の1表面における極性基はリボソームの内部へ向き、他の表面におけるものは外部環境の方へ向く。研究者に薬剤のリボソーム中への装入を可能にさせるのはリン脂質と水とのこの顕著な反応性である。リボソームが形成されると、水に加えた水溶性分子が球の内部中の水性空間中に取込まれ、小胞形成中に溶媒に加えた脂質可溶性分子が脂質二重層中へ

取込まれる。

薬物送達に使用されるリボソームは典型的には直径が2500オングストローム単位〜数ミクロンの範囲内にあり(対照として、赤血球の直径は約10ミクロンである)、通常溶液中に懸濁される。それらは2つの標準形態:流体により分離された若干の脂質二重層で構成される「タマネギ状皮膚」をもつ多重ラメラ小胞(MLV)および完全に流体のコアを囲む単二重層からなる単ラメラ小胞、を有する。単ラメラ小胞は典型的には小(SUV)または大(LUV)である特徴を有する。

適当な環境下で、リボソームはほとんどの任意の細胞型に吸着できる。それらが球を吸着するとリボソームは若干の細胞により取込まれ、または飲み込まれることができる。吸着されたリボソームは細胞膜と脂質を交換することができ、またときどき細胞と融合できる。融合が起るとリボソーム膜は細胞膜中へ取込まれ、リボソームの水性分は細胞中の流体と併合する。

多くの型の細胞により吸着され、結合され、つ

いには吸収され、そのときそれらの内容物を徐々に遊離するリボソームの能力が、リボソームを時間放出薬物供給系に対する優れた候補にする。薬物がリボソームからどのような速さで放出されるかはリボソームの組成、封入薬物の型および細胞の性質を含む多くの因子による。

リボソームのエンドサイトーシスは限定種類の細胞、すなわち異質粒子を摂取できるもの、の中で生ずる。食細胞の細胞がリボソームを吸収すると、細胞は球をリソソームとして知られる細胞下オルガナ中へ移動させ、そこでリボソームの膜が分解されると思われる。リボソームの脂質成分はリソソームからおそらく外方へ移動して細胞膜の一部となり、リソソームの分解に耐性の他のリボソーム成分(例えば一定の薬物)は細胞質内へ入ることができる。

脂質交換はリボソームからの形質膜中への個々の脂質分子の移動(およびその逆)を含み;リボソームの水性分は細胞内へ入らない。脂質交換が起るにはリボソーム脂質が標的細胞に関連した特

定の化学を有さねばならない。リボソーム脂質が細胞膜に接合した後、それが長時間膜中に保持され、または種々の細胞内の膜へ再分配されることができる。薬物がともかくそのような交換性脂質に結合すれば、それは脂質交換中に潜在的に細胞中へ入ることができる。

(6) 疾患

本発明はヒトおよび動物の種々のウイルス、細菌、アレゲンおよび寄生虫疾患との戦いに使用できる。

従って、本発明は次のウイルスとの戦いに使用できる: HIV、B型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス凝集素(A/メソフィス/102/72株、A/Eng1878/69株、A/NT/60/68/29c株、およびA/Q/7/70株、A/PR8/34、A1/CAM/46、並びにA2/シンガポール/157; B型インフルエンザウイルス、例えばB/Lee40)、家禽バストウイルス血球凝集素、ワクシニア、ポリオ、風疹、サイトメガロウイルス、痘瘡、単純ヘルペ

ス1および2型、黄熱、感染性エクトメリアウイルス、牛痘ウイルス、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、ウマ鼻肺炎(ウマ炭疽)ウイルス、ウシの悪性カタルウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、イヌヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス(伝染性単核症およびバーキット・リンパ腫と関連)、マレーク病ウイルス、ヒツジ肺リンパ節腫症(ヒツジ肺腺症)ウイルス、サイトメガロウイルス、アザノウイルス群、ヒト乳頭腫ウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルス、ミンク腸炎ウイルス、サケ類(trout)の伝染性脾臓壊死ウイルス、魚類肉腫ウイルス(種々の系統)、ニワトリ白血病ウイルス(内臓、赤芽球および骨髄芽球)、大理石骨病ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、パラインフルエンザウイルス1、2、3および4、ムンプスウイルス、トルコ(Turkey)ウイルス、カナダ/58、イスラエリテンパーウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルス、例えばインフルエンザB型ウイルス例えばB/Lee40; 狂犬病ウイルス; 東部ウマ脳炎ウイルス; ベネズエラウマ脳

炎ウイルス；西部ウマ脳炎ウイルス；黄熱ウイルス；デング1型ウイルス（＝6型）、デング2型ウイルス（＝5型）、デング3型ウイルス、デング4型ウイルス；日本脳炎ウイルス；キャサナー森林病ウイルス；麻疹ウイルス；ミューリー谷脳炎ウイルス；オムスク出血熱ウイルス（IおよびII型）；セントルイス脳炎ウイルス；ヒトライノウイルス；口蹄疫ウイルス；ポリオウイルス1型；エンテロウイルスポリオ2；エンテロウイルスポリオ3；ニワトリ伝染性気管支炎ウイルス；ブタ伝染性胃腸炎ウイルス；リンパ球性系結核膜炎ウイルス；ラッサウイルス；マチュポウイルス；ピチンデ（Pichinde）ウイルス；タカリベウイルス；乳頭腫ウイルス；シンドビスウイルス；など。

本発明はまた細菌例えばらい病、結核、梅毒および淋疾を起すものとの戦いに使用できる。

本発明はまた寄生虫、例えばマラリアを運ぶ生物体（熱帯熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫など）、住血吸虫症、回線糸状虫および他のフィラ

リア寄生虫、トリパノソーマ、リーシュマニア、シャガズ病、アメーバ症、鉤虫などとの戦いに使用できる。

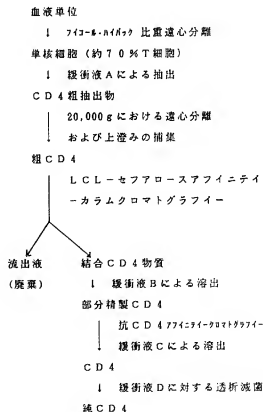
本発明は癌細胞およびリボソームの特定細胞および組織に対する標的性を可能にするので、それはまた癌増殖との戦いに有効であることができる。

(e) 純CD4の製造

HIVによる正常T細胞の破壊にはウイルスによる細胞の感染とその後のウイルスによりコードされる特異糖タンパク質の生成、並びに感染細胞の形質膜中へのこれらの糖タンパク質の挿入が含まれる。この糖タンパク質は表面上にCD4抗原を含む他の細胞に対する親和性を有する。ヒト白血球抗原、CD4、は血液バンクからの血液の遠心分離後に得られたバフィーコートを含む種々の源から、並びにT細胞リンパ系細胞系（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.）から得られるCEM細胞）

から分離することができる。CD4抗原はマドン（Maddon）ほか、セル（Cell）、42、93～104（1985）の操作により精製できる。

この操作に対する一般的図式は次に示される：



精製CD4はすぐに使用でき、また-20℃で2～3月安定である。上記図式中、緩衝液組成は次のとおりであることができる：

緩衝液A = 0.02 M n-オクチル-β-D-グルコシド (OGS)
 0.15 M NaCl
 0.2 M PMSF
 0.01 M トリス、最終pH = 8.0
 緩衝液B = 0.1 M β-マンノシドを含む緩衝液A

緩衝液C = 1.5% (w/w) デオキシコール酸ナトリウム
 1 M 酢酸ナトリウム、最終pH = 4.0
 緩衝液D = 0.1 M 酢酸ナトリウム、最終pH = 4.7

上記緩衝液A中のPMSF(フェニルメチルフルオロ硫酸)は抽出および精製操作の間タンパク質分解の阻止に使用される毒性物質である。しかし、それは後のクロマトグラフィー段階により完全に除去される。

OGS(オクチルガラクトシド)はCD4の抽出に使用される洗浄剤である。後に精製工程にお

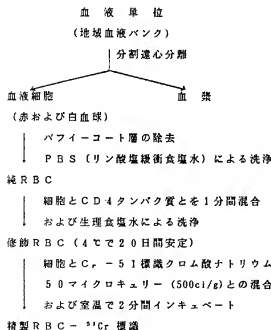
いてそれは天然存在胆汁酸塩であり、毒性でないDOC(デオキシコール酸塩)により置換される。

DOC(デオキシコール酸ナトリウム)は精製CD4中に0.005%の濃度で存在し、本発明により治療したエイズ患者の血液中に約0.000001%の濃度で存在する(それは全く安全である)。

ヒトCD4タンパク質はまた種々の細胞中の組織へCD4分子として得ることができる(ウォルトン(Walton)ほか、セル(Cell)、1988、印刷中)。

(f) エンジンアード赤血球を形成する細胞融合

本発明によるエンジンアード赤血球を形成する一般的な操作が次に略示される：



上記図式中で生成された修飾RBC(赤血球)(未標識)は約50,000分子のCD4(毎細胞を含み、20℃で20日まで安定である)。

クロム標識修飾RBCは毒性研究のみに用いたのでそれらの製造は任意であり、それらは通常治療目的に対する本発明の実施に使用されないがしかしそれらを使用できる。そのような標識細胞は活性物質として本発明を用いる試験管内診断法における使用が見出されよう。

赤血球膜中へCD4を挿入する他の方法は初めにタンパク質をリボソーム膜中へ挿入し、次いでそれを赤血球と融合させて膜中にCD4を含む細胞-リボソームハイブリッドを生成させることである。さらにこの方法は後の融合で細胞、有利には赤血球に対するリボソーム封入分子(有利には細胞毒または治療物質)の送達を生ずる。

赤血球を連続溶解および再封する技術は再封赤血球【イーラー(Ihler)ほか、PNAS、70、2663～2666(1973)】およびエンドサイトーシスによる装入細胞【イーラー(Ihler)

ほか、ジャーナル・オブ・アプライド・バイオケミストリー (J. App. Biochem.)、4、418~435 (1982) の既知概念を基にして開発された。これらの方法は、種々の分子を細胞中へ封入し、その寿命を不変に保つことを可能にする〔ニコラウ (Nicolaou) ほか、EP 83 401364-1 (1983) およびニコラウ (Nicolaou) ほか、アナリス・オブ・ザ・ニュー・アカデミー・オブ・サイエンス (Ann. N. Y. Acad. Sci.)、445、304~315 (1985)〕。本発明には生体中のウイルス感染細胞との最終融合およびその破壊に対する「標的化弾丸」として作用できる修飾赤血球 (またはリボソーム) が含まれる。

リゾチームが酸性pHでリボソームと赤血球ブーストとの融合を誘発することが既に示された〔アービンテ (Arvinte) ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Nat. Acad. Sci.)、83巻、962~966 (1986)〕。その操作においてリゾチームは音波処理小胞 (リボソーム) の外

部膜に共有結合させ、これらの小胞とヒト赤血球ブーストとの融合の誘発に作用させた。融合の強い誘発が最適リゾチームpHで認められた (それはリゾチームを単に懸濁液に加えたときに認められなかった)。この操作は、リゾチームが電気的に中性のリボソーム相互の融合を誘発しないので有用であり、従って、リボソームと細胞との融合に十分適する。

本発明には媒質中にリゾチームを全く存在させないで融合を誘発させる方法が含まれる。これは大規模臨床使用に対するエンジニアド赤血球の形成を非常に容易にする。

(例) エンジニアド赤血球の毒性

エンジニアド赤血球 (種々の捕捉物質例えばイノシトール六リン酸イソシシアナート構造リシンを含む) の寿命がほぼ正常値であることが示された〔ニコラウ (Nicolaou) ほか、アナリス・オブ・ザ・ニュー・アカデミー・オブ・サイエンス (Ann. N. Y. Acad. Sci.)、前掲〕。さらに、これらの細胞の、子孫中の30日の期間

にわたる生体内毒性が追跡された。簡単に記載すると、少量のエンジニアド細胞の注射 (30~40% 薬物積載細胞、すなわち細胞懸濁液のヘマトクリットが30~40% である、約0.1~1 ml を静脈内に注射した) 後、動物血液、例えば子豚の血液、の試料を30日の経過にわたってときどきとった。これをイオン (K、Na、Cl、Caなどを含む) の濃度並びにタンパク質、尿素およびグルコース濃度について検定した。

ゲロニンを封入したマウスRBCの寿命測定値は正常マウスRBCの寿命に比べて有意な変化を示さなかった (ともにマウス中で約11日の半減期を有する)。

毒性試験の間、動物を30日の期間にわたって種々の時間間隔で剖検し、肝臓クーパー細胞および脾臓マクロファージの状態を調べた。遊離免疫毒素 (リシンが毒素であった) の直接接種は細胞内皮系中の組織損傷を示した。脾臓および肝臓中のマクロファージは毒素を循環から除去する

〔ビテッタ (Vitetta) ほか、サイエンス (Science)、

219、644~650 (1983)〕。しかし、本発明により用いた免疫毒素による腎臓細胞に対する損傷がなく、毒素積載エンジニアド細胞が毒性でないことを示した。他のエンジニアド赤血球に対する含有毒素の主標的は脾臓マクロファージであろう。これらの細胞が幹細胞により置換されることができると、生ずる損傷は不可逆性でないであろう。さらに実験証拠は、骨髄中の細胞からのマクロファージの置換のために細胞内皮系を消耗させることが不可能なことを示した〔ファン・ファース・アンド・コーン (Van Furth and Cohn)、ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディスン (J. Exp. Med.)、128、415~424 (1968)〕。

(例) 標的細胞との融合

適当な免疫系の機能化に必要なT4細胞がCD4抗原を有するので、それらが感染細胞に選択的に結合し、ついには溶解される。溶解は培養細胞中への放射性成分例えばCr-51の取込みにより試験管内で測定できる。細胞中の媒質への同位

元素の遊離（ウエル型カウンターを用いてモニターした）は溶解の尺度である。そのような溶解はシンシチウムの形成と（CD4含有細胞とHIV感染細胞との融合により発生するので）相関する。そのような融合は後記の実施例5の操作によりモニターされ、結果は相当する表1（後掲）に示される。

CD4抗原を挿入された赤血球はフリーゼエッチング電子顕微鏡検査並びに薄片電子顕微鏡検査により調べることができる。簡単に記載すると、CD4抗原を有する赤血球をマウス単クローン性抗CD4とともにインキュベートする。洗浄後、これらの細胞を、ヤギ抗マウスIgGでコートした10nm金ビーズとともにインキュベートした。フリーゼフラクチャーレプリカ中で10nmビーズがクロス割断赤血球の周囲の周りに観察された。観察ビーズの数毎細胞はフラクチャーの偶然性に依存し、必ずしもその細胞に結合したビーズの実際の数の尺度ではない。最良の場合にビーズはクロス割断赤血球の1側に沿って40～50nm

の間隔で規則的に並んで見える。エッチングにより生じた「タマネギ型」効果のために赤血球膜からのビーズの距離を正確に決定することができない。同一試料の薄片中に電子濃密10nm金ビーズもまた赤血球の膜表面に観察される。HIV感染H9細胞とともにインキュベートした後のCD4保持赤血球のフリーゼエッチング像は赤血球膜面上の膜タンパク質の分布を変えた100nmの「不規則性」または「押出」を示した。これはウイルスの赤血球との（おそらくCD4抗原に対する）融合を示唆する。

二重層中にCD4を有する調製リボソーム（実施例1、後記、による）はフリーゼエッチング電子顕微鏡検査により調べることができる。300～500nmの範囲の直径の単ラメラおよび多重ラメラの両方であると認められる。リボソームをHIV感染H9細胞とともに8時間インキュベートした後、ウイルス粒子はCD4タンパク質挿入リボソームに結合されるが、しかしこのタンパク質のないものには結合しないことが認められる。

これはまた、本発明により膜中へ挿入されるとタンパク質が適当に配向されることを示す。ウイルス粒子は大きさ（約100nm）および膜タンパク質の存在の両方により確認することができる。リボソームは大きさおよび封入デキストランにより確認された。

CD4リボソームと感染細胞との融合およびリボソームの内容物の細胞内部への送達を示すために次の操作を用いることができる。フェリチンを封入しているCD4-リボソーム〔実施例1（後記）の一般操作による）をHIV感染H9細胞または正常H9細胞とともに8時間インキュベートする。次いで細胞を洗浄して固定する。CD4を有しないがしかしフェリチンを封入しているリボソームを同様を用いる。

薄片電子顕微鏡検査はリボソームに封入されたフェリチンが感染細胞中の脂質小滴へ移動したことを示した。リボソームが感染細胞内の大細胞質液泡内に認められた。細胞の形質膜とのリボソームの融合の例もまた認められた。これらの結果は

リボソームがCD4抗原を有しなかった場合に認められなかった。

膜中にホスファチジルエタノールアミンリサミンロダミン〔ロダミンは蛍光染料であり、こゝでは脂質に結合している）を有して形成され、F1-デキストランを封入するCD4保持リボソームをHIV感染H9細胞とともに8時間インキュベートし、次いで洗浄して固定する。同様の、しかし二重層中に存在するCD4抗原のないリボソームを用いて類似の操作を追跡する。

フリーゼエッチング像は、ウイルス粒子がCD4をもつリボソームに結合したが、そのないものに結合しなかったことを示した。さらにCD4抗原を有するリボソームがHIV感染H9細胞との融合の過程に示された（すなわち、それらが明らかな膜の連続性を示した）。CD4抗原の存在しないリボソームは細胞膜の上に載っているが、しかし実際の融合の証拠を示さなかった。

これらの細胞の蛍光分析は、リボソームがそれらの二重層中にCD4抗原、並びに脂質-ロダ

ミン接合体を有した実験で有意なローダミン蛍光を示した。この蛍光は拡散し、また中断したが、しかしすべての場合に細胞の核から排除された。拡散蛍光はリボソームが細胞の形質膜と融合したことを示す。中断蛍光は細胞表面上に集まるがしかし融合しないけれどもおそらく結合および融合の初期段階にあるリボソームのためであることができる。それはまた細胞の消化液中のリボソーム成分の隔離、並びにリボソームのエンドサイトーシスの結果に基づくことができる。しかし、核からの染料の排除が細胞がなお生存可能なことを示す。

同様の試験に未感染健全H9細胞を用いた場合に、単にときどき蛍光が細胞表面に付着したリボソームから検出された。CD4抗原をもたないリボソームを用いたときにH9細胞の感染または非感染に関係なく有意な蛍光が検出されなかった。

CD4抗原をもつ細胞はまたウイルス糖タンパク質(gp120)をもつ感染細胞に結合するので、毒素積載細胞またはリボソーム(膜中に取込

まれたCD4抗原を有する)の使用はこれらの細胞またはリボソームとHIV感染細胞とを融合させ、その後、それらが健全なT4細胞に結合してそれと融合できる前に後者が破壊される。これは患者の免疫系をHIV感染細胞によるそれ以上の破壊から、望ましくはそれが修復できない損傷をうける前に防止作用をする。

本発明に有利に使用できる毒素の限定的でない例にはリシン(MW25,000のタンパク質、その毒性A鎖が必要なすべてである)、アブリン(一定植物の種子から得られる有毒アルブミン)、ゲロニン(MW23,000の、非免疫源である利点を有するタンパク質)およびジフテリア毒素が含まれる。これらの多くは市販されている。ゲロニンはピール(Pihl)ほか、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 255, 6947~6953(1980)の方法により調製される。本発明の実施例が後に示され、毒素としてリシンおよび(または)ゲロニンの使用に関して示されるが、しかし、任意の適当な細胞障害

物質を、基本操作を大きく変形することなくこれらの代りに用いることができる。

(i) 臨床使用

本発明を構成する修饰細胞を、HIV感染リンパ球を抹消循環から選択的に排除することによるエイズの治療に用いることができる。操作にはエイズウイルスに対する受容体(CD4抗原)を自己赤血球膜中へ挿入することを包含される。感染細胞はその外部表面上にgp120フロンゲンタンパク質を発現し従ってCD4含有細胞を結合する。エイズ患者中でリンパ球(通常CD4抗原をもつ)はHIV感染細胞(通常gp120タンパク質をもつ)に結合し、これが、すべての細胞が感染するかまたは死ぬまで感染の拡散を生じ、従って免疫系の一般の減退をもたらす。もちろん、HIV感染リンパ球は、正確にTヘルパーリンパ球ではなく、CD4をもつ細胞と結合し、融合する。前記のように、これにはCD4をもつ赤血球が含まれる。CD4-赤血球がそこに細胞障害物質を含む場合に、融合は両細胞の死を生ずる。

さらに、ウイルス自体がCD4タンパク質に結合するので、血流中の遊離ウイルスがCD4保持赤血球に結合し、その中に隔離される。赤血球が遺伝装置を欠くのでウイルスは其中で繁殖できない。従って二重の効果があり：血流中の少量の遊離ウイルスを隔離し、また一層重要なことにはgp120をもつ感染リンパ球が健全なT細胞に結合しウイルスを拡散することができる前にそれと融合し、破壊する。

エンジュアド赤血球の静脈内注射に加えて、毒素をリボソームの使用により他の組織中へ選択的に導入することができる。例えば、リボソーム(その二重層内にCD4抗原をもち、リボソーム内に封入されたゲロニン、リシンまたは若干の他の毒素を含有する)のリンパ節内への組織内(interstitial)注射(例えば指間)によりリンパ節中に存在する感染細胞を選択的に攻撃することができる。そのような治療の方法の利点は、こゝに提供される方法により発生されるリンパ球が小細胞の大きさに接近する大きさであり、従っ

て注射後のエンドサイトーシスにより分解されないことである。

さらに、本発明を構成するCD4をもつ細胞およびリボソームは、試験管内検定の一部としてgp120をもつ(すなわち、感染した)リンパ球の存在の検出に使用できる(後記実施例5の操作を用いる)。そのような操作には本発明による細胞またはリボソームの生成が含まれる。診断試薬を構成する細胞またはリボソームはそれらの膜中にCD4抗原を有し、それらの細胞質中に細胞障害物質を含有し、放射性物質、有利にはクロム-51で標識される。HIV感染細胞がgp120ウィルスタンパク質をそれらの膜内にもつてそのような細胞は、CD4をもち、毒素を含有し、放射性標識した細胞と融合し、次いで放射性標識を周囲媒質中へ遊離する。

本発明を診断試薬として用いるには、患者、場合によりエイズをもつ疑いのあるもの、から血液をとり、白血球(殊にリンパ球)を標準操作(例えば、本明細書に既に記載した操作)により捕集

らずしも疾患の発生を示さないで、単に患者がウイルスまたはその抗原の若干にさらされたことを示す。こゝに開示された診断法は、ウイルスが複製されている感染細胞の存在、すなわち活性感染、を示す利点を有する。出願人はそれらのすべての等価物を期待する意図である。

本発明を構成する細胞およびリボソームは、さらに治療量の抗ウイルス薬を細胞例えばマクロファージおよびクッパー細胞に直接送達する手段として利用できる。後者の型の細胞(細胞内皮系の一部)はHIVに対する受容体をもたない。しかしHIV感染細胞はそれらの表面上に異質抗原を発現し、ついにはマクロファージおよびクッパー細胞により吸収され捕食される。この経路は細胞内皮系の細胞の感染に、不本意にもそれらの表面上のCD4抗原がウイルスにより使用される。これらの細胞を、ウイルスの住居となりその複製を許すことから保護するために本発明の細胞およびリボソームを、治療量の抗ウイルス薬をマクロファージ、クッパー細胞および細胞内皮系の他の細胞

し、リボソームが例示のために使用される後記実施例5に記載されるように、小分剂量を試験管内で本発明の細胞またはリボソームの分剂量と混合する。37℃またはその付近で細胞融合が起る十分な時間、最速には24時間まで、インキュベートした後、細胞媒質の試料を捕集し、放射能を測定する。測定は正常なヒトの血液の白血球を対照として用いて二重に行なわれる。対照細胞と比較して患者からとった細胞の周囲の媒質中の放射能(補正式による計算後)の高水準の検出は融合、それにより患者の血液中にgp120タンパク質を含む細胞の存在することを示す。後者は前記細胞がエイズウイルスで感染されたことおよび従って患者がエイズをもつことを意味すると解釈される。CD4以外の抗原を本発明の細胞またはリボソームの膜内に導入できるので他のウイルス疾患を、この操作を用いて診断することができる。これまでは、エイズに対する診断操作は通常エイズをもつ疑いのある患者の血液中の抗HIV抗体の存在の検出による。しかし、そのような所見は必

に直接送達するために使用できる。これは、これらの食細胞の細胞が感染細胞および他のウイルス汚染断片を摂取した後ウイルスで感染されるのを保護する効果を有する。

例としてAZT(アジド-3'-デオキシチミジン)、リバリンおよびDDCが本発明の細胞およびリボソーム内に容易に封入される。これは1987年3月24日に発行された米国特許第4,652,449号に開示された封入操作を用いることにより最も容易に達成され、それらの開示は特にこゝに参照される。治療薬の封入の前または後に、本発明の操作を用いて適当な抗原タンパク質(エイズが治療される疾患である場合にはCD4)を赤血球およびリボソームの膜中へ挿入する。その結果、赤血球またはリボソームは中に治療量の活性抗ウイルス薬を含有し、それをエイズウイルスで感染された細胞へ向かわせ、その細胞との融合を誘発させる作用をするCD4抗原を膜中に取込んでいる。融合後、この融合細胞複合体は異質(感染細胞または細胞類の膜中のウイルスコードタン

バク質のため)と認識され、マクロファージおよび他の細胞内皮細胞により捕食される。その結果、抗エイズ薬が直接食細胞の細胞内へ導入され、これらの細胞中のウイルスの複製を防ぎ、従ってウイルスがそれ自体複製できる他の道筋を閉鎖する。

そのような方法の利点は、薬物が血液中に遊離しておらず、従って望ましくなく有害な副作用の生起に利用できないことである。さらに、薬物を運ぶ細胞またはリボソームの膜内の抗原が、膜中に $gp120$ タンパク質をもつ細胞(すなわち、HIV感染細胞)に対し特異性であり、健全な細胞が薬物にさらされず、従って薬物の固有の毒性が非常に低下する。最終の結果は薬物の全量を減少でき、従って全コストが低下され、薬物の有効治療物質濃度がまた増加される(それが身体全体に無駄に拡散しないため)。他の利点は、薬物が抗原修飾された赤血球およびリボソーム内に有効に隔離されるので、身体の組織液(ウイルス感染細胞が存在することがほとんどない場所)に拡散することができないことである。

ることが含まれ、典型的には $5\text{ }\mu\text{g}$ の全重量を用いた。この混合物(最終濃度 $10\sim 30\text{ mM}$)を窒素の流れた下、次に真空中に1時間(残留する微量の有機溶媒を除去するため)薄膜に乾燥した。リボソームは逆相蒸発(reverse phase evaporation)により調製した[スゾカ(Szoka)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nat. Acad. Sci.)、USA、75巻、4194~4198(1978)参照]。簡単に記載すると、脂質物質を新蒸留エーテル 4.5 ml に溶解し、浴型音波処理器中でリン酸緩衝食塩水(PBS) 1.5 ml とともに15秒間音波処理した。可溶性は洗浄剤/脂質モル比が8:1にあるようにn-オクテール-D-グルコビラノシド(OG)の添加により補助した。エーテルを回転蒸発器中で減圧下に除去し、リボソーム懸濁液をPBSで、またはホウ酸緩衝液pH7.2、中に 4.5 ml に希釈した。あるいはリボソームを、疎水性ビーズ上の吸着を用いるフィリポット(Philippot)

本発明は次に以下の限定的でない実施例に関連して記載される。

実施例

実施例1

ヒト白血球抗原CD4の赤血球形質膜中への挿入

(a) リボソームの典型的な調製を次のように行なった: 使用する脂質(使用前に2:1(v/v)クロロホルム/エタノール中に -30°C で保存した)を種々の割合で混合した。最も普通の操作にはホスファチジルエタノールアミン(シグマ・ケミカル社(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)から購入し、シングレトン(Singleton)ほか、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・オイル・ケミスト・ソサエティー(J. Am. Oil. Chem. Soc.)、42巻、53~61(1965))に従って精製)、ホスファチジルコリン(シグマ・ケミカル社製)ホスファチジルセリン(シグマ社製)およびコレステロール(シグマ社製)をそれぞれ1:2:1:1.5のモル比で混合す

ほか、ジオシミカ・エ・ビオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、137~143(1983)に記載された操作により発生させることができる。

(b) 精製のために、リボソームの懸濁液(ホウ酸緩衝液pH7.2、 1 ml 中に脂質 $5\text{ }\mu\text{g}$ を含む)を取込ませるタンパク質を含む溶液と混合した。精製CD4(1%のOGを含むPBS中 $4\sim 6\text{ }\mu\text{g}$ タンパク質/ ml の濃度)で脂質-洗浄剤混合物に加えた。脂質とタンパク質との重量比は5~10に維持した。ジメチルスベリミダート(シグマ社から購入)を 10°C の温度で $1.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終スベリミダート濃度に達するまで徐々に加えた。次いで混合物を 10°C の温度で30分間インキュベートし、次いでホウ酸緩衝液に対して 4°C の温度で2時間透析した。生じた混合物を次に、未反応タンパク質からリボソームを分離するためにセファロース(Sepharese)4Bカラム上でクロマトグラフにかけた。

この操作はCD4抗原約5,000～20,000分子
毎リボソームを生ずる。リボソームはフロース
イトメトリーおよびフリーズフラクチャーを用
いて確認した。それらの内部容積は12～16
リットル毎モル脂質であると認められ、それら
の平均外径は約450nmであると認められた。

純CD4を有する再構成に加えて、またタン
パク質混合物の一部としてCD4の量に等しい
量のリゾチームを用いて操作を行なった。これ
はそのときCD4とともに取込まれ、修飾赤血
球を生成させる後者の融合段階中のリボソーム
相互の融合を防ぐ利点を有する。

リゾチームの酵素活性は(リゾチームが使用
されれば)ミクロコッカス・レイソデイクチカ
ス(Micrococcus liseidekticus)検定
(アービンテ(Arvinte)ほか、プロシーデイン
グス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オ
ブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.),
USA, 83, 962～966(1986))
により検定することができる。

リボソームハイブリッドの小試料の形質膜中
のCD4抗原の存在を定量的に測定した。

あるいは、CD4をリボソームの使用なく挿
入することができる。このとき、酢酸ナトリウ
ム緩衝液(0.02N、pH4.7、0.145M-
NaCl)15ml、CD4を0.1～0.4mg含む溶
液(1%オクタリルグリコシド中)60μlおよ
び赤血球懸濁液(RBCペレット50μlと
PBS、pH7.4、1mlとの混合により生成)
30μlをエッペンドルフ(Eppendorf)遠心
管(15mlサイズが便宜であった)中で混合し、
37℃で60～90秒間インキュベートした。
上記3溶液(緩衝液、タンパク質およびRBC)
は混合前に37℃に加熱すべきである。インキ
ューション後、PBS、pH7.4、10mlを加
え(細胞の低pHに対する暴露を停止するため)、
次いで反応混合物をエッペンドルフ遠心分離機
の固定角ローター中で3000rpmで4分間遠心分
離することにより細胞を濃縮した。上澄みを除
き、次いで細胞をPBS、pH7.4、中に再懸濁

(c) 新全血を同容積のリン酸緩衝食塩水(PBS、
5mMリン酸塩、145mM-NaCl、pH7.4)
で希釈し、遠心分離(640g、4℃で30分)
により血漿から分離した。上澄みおよび白血球
のバフィーコートはともに廃棄した。多形核白
血球を吸水性綿濾過により除去した。次いで赤
血球をPBS、pH7.4、中に再懸濁し、次いで
さらに3回洗浄する(各2,000rpmで4℃で30
分間遠心分離)。

(d) ヘマトクリットを70%に調整し、次いで赤
血球(約500～1000万)を同容積のリボ
ソーム懸濁液(リゾチームを有するかまたは有
さず、1～10リボソーム毎赤血球の比を与え
る十分なリボソームを使用)および酢酸ナトリ
ウム緩衝液(0.02M酢酸ナトリウム/0.145
M-NaCl)1.4mlとともに最終pH5.5で、
37℃の温度で30分間インキュベートした。
次いで1400gで、20℃で20分間遠心分離す
ることにより赤血球を捕集した。蛍光標識抗
CD4抗体による免疫蛍光検定を用いて赤血球

させた。さらにPBS中で同条件下に3洗浄を
行なった。

実施例2 CD4抗原の測定

取込みCD4抗原の抗原活性の存在をフルオ
レセインイソチオシアナート標識抗CD4抗体を用
いて蛍光活性化細胞選別法(コールター(Coulter)
からのエピックス(Epics)V細胞選別器を使用)
により測定した。この測定に2試料を用いた:

試料A: CD4分子を取込んだ赤血球、

試料B: CD4タンパク質を含まない赤血球。

以下の記載においてFITCはタンパク質類に対
する蛍光標識のフルオレセインイソチオシアナ
ートを示す。

用いた操作は次のとおりであった:

両試料、AおよびB、をPBS、pH7.4、で洗
浄し、遠心分離(エッペンドルフ遠心分離機中
で3,000rpmで4分間)により濃縮した。各試験に
おいて、細胞ペレット上に次の単クローン性抗
体の1溶液、各10μlを層にした:

(i) 抗T4-FITC [Pel-Freez 単クローン性

抗体、M102-10-OAX、Brown Deer、W153223) 10 μ g、

- (2) 「Leu-3a-Pe」(抗ヒトLeu-3a F1 コエリトリン接合体、ベクトン・ディキンソン (Becton Dickinson, Mountain View, CA 94039 製) 10 μ g、
- (3) 「OKT-4-A-FITC」(Ortho-mune OKT-4 マウス単クローン性抗体-FITC 接合体、抗-ヒトインデュサー/ヘルパーT細胞、オルト・ディグノステック・システムズ社 (Ortho Diagnostic Systems, Inc., Raritan, NJ 08869 製) 10 μ g。

懸濁液をかくはんして細胞塊を抗体溶液と混合した。細胞を22℃で15分間蛍光標識抗CD4抗体と反応させた。

インキュベーション後、PBS、pH7.4、1mlを2試料に加え、細胞懸濁液を再び遠心分離(前記のように)により濃縮した。上澄み(AおよびB)は細胞に結合しなかった抗体を含有し、これを除去した。PBSによる洗浄および遠心分離機

による濃縮の操作を2回繰返して各上澄みを除去した。

細胞をPBS中に懸濁させて試験した。試料Aの細胞のみが顕微鏡検査、分光測定およびFACS検定により蛍光性であったので、それだけがそれらの液中へCD4抗原を取込んだと考えることができた。

さらに、ブールした上澄み中の蛍光物質(FITC)の量を、470nmの励起波長および480~600nmにおける蛍光波長検定を用いて蛍光分光法により測定した。

タンパク質蛍光測定は280nmの励起波長を前記と同じ蛍光範囲で用いた。

ブールした上澄みAおよびB間の蛍光強度の差異は赤血球に結合した蛍光標識の量に正比例した。従って、初期抗体濃度および赤血球の数を知らずCD4分子毎細胞の数に対する平均値を計算することが簡単であった。

上記操作において、各試料AおよびBは約1400万の細胞を含み、蛍光単クローン性抗体の全量は

約0.0021mlであった。CD4抗原の平均分子量が約58,000ダルトンであり、各インキュベーション混合物は約7兆個の抗体分子を含有した。

これらの値を

$$R = \frac{\text{上澄みAの蛍光}}{\text{上澄みBの蛍光}}$$

および、 $N = \text{抗体分子の数} \times (1 - R)$

に用い、タンパク質蛍光スペクトル(励起=280nm)から計算した値は $R = 1.1$ であった。

FITC蛍光に対する相当する値は $R = 1.33$ であった。

細胞膜中のCD4分子が抗体により飽和されたと仮定すると、結合した抗体の数は取込んだCD4分子の数(上式中のN)に等しい。 $R = 1.1$ を用いるとNに対する値は37,000であった。

$R = 1.33$ を用いると値は $N = 59,300$ であった。用いた値はタンパク質蛍光またはタンパク質結合FITC蛍光を測定するかにより、結果は従ってこれらの値の平均である。従って我々の計算は37,000~60,000CD4分子毎細胞を示した。

実施例3 赤血球中のリシン毒素の封入

(a) 実施例1に示した操作により調製した赤血球を冷0.15M-NaClで数回洗浄し、遠心分離してペレットを得た。次いで細胞をPBS中にpH7.4で再懸濁した。

(b) 次いで赤血球の懸濁液をPBS、pH7.4、中に0.1mMまでの純リシン毒素(シグマ・ケミカル社の精製A類)を含む溶液で洗浄した。赤血球を1,000gで10分間遠心分離し、上澄みを廃棄し、最終ヘマトクリットを食塩水で70%に調整した。

(c) 赤血球懸濁液を4℃に冷却し、0.41平方メートルの透析表面および13.4ミクロンの膜厚を有する普通の血液透析器の血液両室中へ連続的に流れさせた。蠕動ポンプで20~60ml/分の定赤血球流量を維持した。血液透析器は低イオン強度緩衝液(0.01Mリン酸ナトリウム、0.01M炭酸水素ナトリウム、0.002Mグルコース)をpH7.4で、温度を4℃に維持して500ml/分の定流量で供給した。この透析段

階の間に、赤血球を、8.3のK対Na比で1M塩化物塩を含む(毎リットル)高張液1/10容積の添加による再封の前に37℃で溶解して捕集した(高ATP含量を再封細胞中に維持するため)。

- (d) 次いで細胞懸濁液を捕集し、37℃で30分間維持して細胞を再封させた。次いで赤血球を、1mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウムおよび2mMグルコースを含む(毎リットル)0.15M-NaCl溶液で2回洗浄する。次いで赤血球を、選択ヘマトクリットで融合前に未変性自己血漿中に懸濁させる。

実施例 4

赤血球中ヘリシンまたはゲロニン毒素を封入させる際の操作

- (a) 実施例1の同じ脂質混合物で開始し、残留有機溶媒の蒸発によりそれを取り、封入させる毒性物質(例えば、リシン、ゲロニンなど)をフイリポット(Philippot)ほかにより記載された操作によりHEPES緩衝液

(10mM-HEPES (pH7.4) / 1mM-EGTA / 150mM-NaCl)中で導入した。約0.01~0.02μg毎十億リボソームの最終値を与える十分な毒素を用いた。2相系を短時間過剰し、脂質を混合物中の成分の最高転移温度以上の温度で30分間水和させた。少量の洗浄剤(トライトン(Triton)X-100)を加え、試料の容積をHEPES緩衝液で0.625mlに調整した。激しく振り混ぜた後洗浄剤を除去した。

- (b) 3つの異なる方法を洗浄剤の除去に用いた:
- 試料を1cm幅の透析袋中に置き、0.01Mトリス-HCl (pH7.4) / 1mM-EDTA / 0.15M-NaCl 1ℓに対し、媒質を4交換して透析した。
 - 透析媒質の量を100mlに減少し、バイオビーズ(Bio-Beads)(型SM-2、バイオラド社(Bio-Rad, Richmond, CA)製)を袋の外側緩衝液中に加えた。媒質は交換しなかった。

iii 若干の試験において、バイオビーズを試験管中のリボソーム調製物に直接加え、回転ミキサー上に置き、10RPMで少なくとも3時間回転した。

- (c) 必要なときには、リボソーム懸濁液をセファロス4Bカラムに通して非封入物質を除去した。次いでリシン含有リボソームを実施例1におけるようにリゾチームおよびCD4の挿入に用いる。
- (d) 次いで赤血球を実施例1に記載のようにリシン(またはゲロニン)含有リボソームとともにインキュベートする。融合効率は蛍光顕微鏡検査により、およびFACS分析によりモニターした。大規模製造に対し、蛍光標識が単にモニターのために要求されたので蛍光標識なくリシンを用いて操作を行うことができる。

実施例 5

ゲロニンを含むCD4-リボソームによる
HIV感染細胞の試験管内相互作用

- (a) T細胞集団、H9、をHT細胞系からクローニ化し、細胞の若干をHIV分離株で持続感染した。次いで細胞をRPMI 1640 媒質(10%補体除去ウシ胎仔血清、0.2mMグルタミンを含む)中でヨフェ(Yoffe)ほか、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nat. Acad. Sci.) USA、84、1429~1433(1987)に記載されたように培養する。H9/HIV細胞は光学顕微鏡検査により試験したときに未感染細胞とは形態的に区別できない。従って、H9/HIV細胞によるウイルス生成は電子顕微鏡検査並びに標準逆転写酵素検定によりモニターした。

- (b) 若干が抗HIV抗体に対し陰性であり、若干が陽性であった血液供与者からCD4抗原を含む細胞を得た(ヨフェ(Yoffe)ほか、前掲、

に記載されたように]。

- (c) 細胞を、(Cr-51)クロム酸ナトリウム 0.5 mCi (ニュー・イングランド・ニューグリア社 (New England Nuclear, Boston, MA) 製)を用いて37℃で90分間標識し、次いでリン酸塩緩衝食塩水で3回洗浄した。次いで標識細胞を10,000細胞毎ウエルの濃度に培養皿中へ塗布した。
- (d) CD4-リボソーム、CD4-リボソームプラス遊離ゲロニン、およびゲロニン封入CD4-リボソームのそれぞれを、T細胞を入れた個々のウエルに、5リボソーム毎T細胞の比に加えた。次いで非感染H9細胞およびHIV/H9細胞を個々にそれぞれのリボソーム調製物とともに37℃で18時間インキュベートする。
- (e) インキュベーション後、培養から上澄み液の100 μ l分測量を捕集し、放射能を液体シンチレーションにより測定した。各試験に対し試験を3回行なった(すなわち、3培養を各試験に用いる)。結果はパーセント比クロム-51

遊離 (SP REL) に関して解釈され、それは細胞融合の程度を示し、式、

$$SP REL = \frac{ER - SR}{MR - SR}$$

(式中、

ER = 試験遊離

MR = 最大遊離

SR = 自然遊離 である)

により示される。

自然遊離 (SR) は標識細胞 (すなわち、H9またはHIV/H9) のみを入れたウエル中の上澄み液から0.1 ml分測量を捕集することにより測定した。

最大遊離は1%トライトンX-100、0.1 mlで溶解した標識細胞の上澄み液0.1 mlをとるにより測定した。

放射能はウエルカウンターを用いて測定した。

- (f) 18時間のインキュベーション後にH9細胞およびHIV/H9細胞の両方を回収し、洗浄し、トリパンブルーで常法により染色して生存

の程度を測定した。

有意量のCr-51遊離がHIV感染H9細胞をCD4抗原およびゲロニンの両方を含むリボソームに暴露した試験にのみ認められ、CD4-リボソームのみを用いた場合、またはゲロニンが培養中に遊離しCD4-リボソーム内に封入されなかった場合には認められなかった。この試験に対する結果は表1に示される。

表 1

エンジマティックと感染および正常H9細胞との融合後のCr-51の遊離

試験 細胞	遊離物	比遊離
1 H9	---	2800 cpm
2 H9	CD4-リボソーム	2800 cpm
3 H9	CD4-リボソーム + 遊離ゲロニン	2800 cpm
4 H9	CD4-リボソーム (ゲロニン含有)	2800 cpm
5 HIV/H9	---	2800 cpm
6 HIV/H9	CD4-リボソーム	2800 cpm
7 HIV/H9	CD4-リボソーム + 遊離ゲロニン	2800 cpm
8 HIV/H9	CD4-リボソーム (ゲロニン含有)	5700 cpm

* 実施例5により37℃で18時間インキュベートした後の10,000細胞当りのcpmとして示した比遊離

** 遊離ゲロニン濃度は0.02 μ g/ml 10⁵リボソームであった。

実施例 6

エンジニアド赤血球による抗HIV

陽性患者の臨床治療

抗HIV抗体に対して陽性と試験されたヒト患者はリシン、アブリン、ゲロニンまたはジフテリア毒素を含有するエンジニアド赤血球で次のように治療される。患者は充填エンジニアド赤血球（実質的にすべての細胞がCD4抗原および細胞毒を含む）の食塩水懸濁液20mlまでを静脈内（例えば腕中）に注射される。患者の状態を循環中の抗HIV抗体の濃度の測定並びに患者の状態の一般的進行によりモニターする。初期注射は医師が是認されたと考えたと追加注射により事後処置することができる。

実施例 7

リボソームおよびエンジニアド赤血球

を用いるARCを有する患者の治療

ARC（エイズ関連コンプレックス）を有すると思われるヒト患者は実施例6とは同様容態に対して治療される。しかし、このとき患者はエ

ンジニアド赤血球とリボソーム（ともに膜中のCD4および細胞毒を含有する）との組合せで注射される。この疾患状態における主療がリンパ節であるので、有利には患者は組織内（例えば指間）に約1000億個のリボソームおよび最適活性量の修飾赤血球の混合物を注射される。患者の状態は実施例6におけるようにモニターされ、必要に応じて追加治療が与えられる。

実施例 8

AZTを含有するエンジニアド赤血球による抗HIV陽性患者の臨床治療

抗HIV抗体に対しまたは本出願において開示された診断法により陽性と試験された患者はアジド-3'-デオキシチミジン（AZT）を含む本発明の抗原修飾赤血球またはリボソームで次のように治療される。患者は充填赤血球またはリボソーム（該細胞またはリボソームは実質的にすべてCD4抗原および細胞質隔離治療量のAZTを含有する）の食塩水懸濁液20mlまでを静脈内（例えば腕中）に注射される。そのような処置は臨床

医により調整され、薬物の全用量は安全限界内、最適には4〜6時間当たり100〜300mg、に保たれる。次いで患者の状態が循環中の抗HIV抗体の存在の測定（または本出願において示される診断法により）、並びに患者の状態の一般的進行がモニターされる。次いで初期注射は、主治医が是認されたと考えたと4〜6時間毎に追加注射により事後処置される。

明細書および特許請求の範囲が本発明の例示であって限定でなく、また発明の精神および範囲内の他の態様が当業者に直想されたと理解される。

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

A 61 K 39/00
45/08
G 01 N 33/544
33/569

G-7252-4C
7252-4C
A-7906-2G
H-7906-2G

手続補正書(方式)

63.10.17

昭和 年 月 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示 昭和63年特許願第164103号

2. 発明の名称 導入抗原タンパク質を有する動物
由来細胞

3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 バイオフォア コーポレーション

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 211-8141

氏 名 (5895) 弁理士 中 村



5. 補正命令の日付 昭和63年9月27日

6. 補正の対象

願書の特許出願人の属及び
代理権を証明する書面及び
明細書

7. 補正の内容 別紙のとおり

願書に最初に添付した明細書の浄書
(内容に変更なし)



方式
審 査

